

## Production of poly-beta-hydroxybutyrate in transformed escherichia coli

**Publication number:** JP5507410T

**Publication date:** 1993-10-28

**Inventor:**

**Applicant:**

**Classification:**

**- international:** C12N1/21; C12N15/52; C12P7/62; C12N1/21;  
C12N15/52; C12P7/62; (IPC1-7): C12N1/21;  
C12N15/52; C12P7/62; C12P7/62; C12R1/19

**- european:** C12N15/52; C12P7/62A

**Application number:** JP19910510838T 19910520

**Priority number(s):** WO1991US03547 19910520; US19900528549  
19900525

**Also published as:**



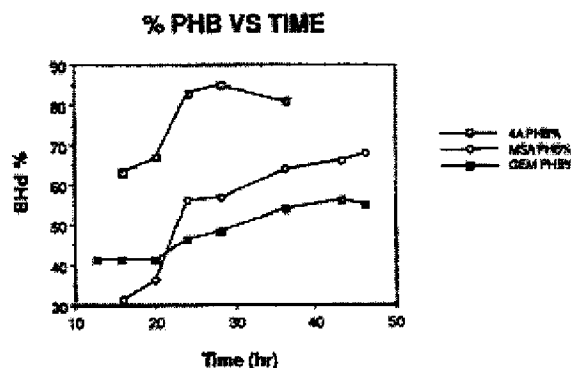
WO9118993 (A)  
EP0535065 (A1)  
US5334520 (A1)  
FI925333 (A)  
EP0535065 (A0)

**Report a data error he**

Abstract not available for JP5507410T

Abstract of corresponding document: **US5334520**

Methods are provided for enhancing the production of PHB from a transformed *E. coli* host which includes the genes coding for the PHB biosynthetic pathway. By inserting the genes coding for PHB into a host which includes a lactose utilization system, a low cost minimal medium including whey can be used as the fuel and carbon source for PHB production. A plasmid which codes for the PHB biosynthetic pathway plus four hundred extra bases on either side of the first and last genes in the pathway has been inserted into the host and has been shown to produce a larger amount of PHB accumulation in a shorter period of time than other plasmid constructs.  $\text{CaCl}_2$  has been shown to be an effective agglomerating agent for agglomerating PHB which has been produced in a transformed *E. coli* host.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑫ 公表特許公報(A)

平5-507410

⑬ 公表 平成5年(1993)10月28日

⑭ Int. Cl.<sup>5</sup>  
C 12 N 1/21  
15/52

識別記号

庁内整理番号

7236-4B

審査請求 未請求

予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

8931-4B C 12 N 15/00

A※

(全7頁)

⑮ 発明の名称 形質転換したエセリキヤ・コリにおけるポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩の改良生成

⑯ 特 願 平3-510838

⑰ 出 願 平3(1991)5月20日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)11月25日

⑲ 国際出願 PCT/US91/03547

⑳ 国際公開番号 WO91/18993

㉑ 国際公開日 平3(1991)12月12日

優先権主張 ㉒ 1990年5月25日 ㉓ 米国(US) ㉔ 528,549

⑳ 発 明 者 デニス、ダグラス・イー

アメリカ合衆国22486バージニア州、ウェイヤーズ・ケイブ、ボックス92エイ、ルート 2番

㉑ 出 願 人 センター・フオー・イノベイテ  
イブ・テクノロジー

アメリカ合衆国22070バージニア州、ハーンドン、ロック・ヒル・ロード 2214番、スイート600、スイアイティ・ビルディング

㉒ 代 理 人 弁理士 青 山 蓓 外 2 名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

このように私の発明を述べたように、私が新規なものとして請求し、特許証により保護することを望むものは以下の通りである。

1. ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸を含んでいるベクターにより形質転換されたラクトース利用系を有するエセリキヤ・コリ細菌宿主。

2. 該デオキシリボ核酸配列が、該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において、3つの遺伝子配列の最初の前の該デオキシリボ核酸配列に位置する最初の400ヌクレオシド塩基及び該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において該3つの遺伝子配列の第3の後の該デオキシリボ核酸配列に位置する第2の400ヌクレオシド塩基をほぼ含む請求項1のエセリキヤ・コリ細菌宿主。

3. 以下のATCC寄託番号68329を有する請求項2のエセリキヤ・コリ細菌宿主。

4. 該宿主のエセリキヤ・コリ株HMS 174から誘導される請求項1のエセリキヤ・コリ細菌宿主。

5. 該ベクターがプラスミドpT218Uである請求項1のエセリキヤ・コリ細菌宿主。

6. ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含んでいるベクターにより形質転換されたエセリキヤ・コリ細菌宿主であって、該エセリキヤ・コリ細菌宿主は、回収しうる量においてポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を生成するため炭素源としてホエイを用いることができる。

7. 該デオキシリボ核酸配列が、該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において3つの遺伝子配列の最初の前の該デオキシリボ核酸配列に位置する最初の400ヌクレオシド塩基及び該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において該3つの遺伝子配列の第3の後の該デオキシリボ核酸配列に位置する第2の400ヌクレオシド塩基をほぼ含む請求項6のエセリキヤ・コリ細菌宿主。

8. ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸配

列を含んでいるベクターにより形質転換されたエセリキヤ・コリ細菌宿主であって、該エセリキヤ・コリ細菌宿主は回収しうる量においてポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を生成するため炭素源として最小増地を用いる能力を有する。

9. 該デオキシリボ核酸配列が、該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において、3つの遺伝子配列の最初の前の該デオキシリボ核酸配列に位置する最初の400ヌクレオシド塩基及び該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において該3つの遺伝子配列の第3の後の該デオキシリボ核酸配列に位置する第2の400ヌクレオシド塩基をほぼ含む請求項8のエセリキヤ・コリ細菌宿主。

10. 最小増地及びホエイを含む形質転換されたエセリキヤ・コリ宿主にポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を生成するための増地であって、該形質転換されたエセリキヤ・コリ宿主はポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路を含み、ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩の生成のため炭素源として該ホエイを利用する能力を有する。

11. 該最小増地が該増地の約20%であり、該ホエイが該増地の約40%であり、そして水が該増地の約40%である請求項10の増地。

12. 0.6%パーセントNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、

0.3%パーセントKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、

0.1%パーセント塩化アンモニウム、

0.05%パーセント塩化ナトリウム、

58.84%パーセント水、

0.012%パーセント硫酸マグネシウム、

0.0005%パーセントチアミン、

0.01%パーセントカザミノ酸及び

40%パーセントホエイ増地

をほぼ含む、形質転換されたエセリキヤ・コリ宿主にポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を生成させるための増地。

13. 以下の炭源を含むポリ-β-ヒドロキシ酪酸の製造法。

エセリキヤ・コリ細菌宿主の培養を供給すること、各宿主はラクトース利用系

を有し、各宿主は、ポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含んでいるベクターにより形質転換されている。

ホエイを含んでいる最小培地に24時間より大の期間、エセリキア・コリ細菌宿主の培養を生育すること、該エセリキア・コリ細菌宿主の各々は細胞内のポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩を生成する。

該培養中に該エセリキア・コリ細菌宿主を溶解し、溶液中に該ポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩を放出すること、及び

該ポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩を集めること。

14. 集めることの該段階が溶解したエセリキア・コリ細菌宿主及びポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩を含んでいる該溶液を固酸マグネシウム、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム及び塩化カルシウムからなる群から選ばれたイオン試薬にさらす段階を含み、該イオン試薬は該ポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩を固化するのに十分な濃度である請求項13の方法。

15. 該イオン溶液が1モルと1ミリモルの間にわたる濃度で塩化カルシウムである請求項14の方法。

16. 塩化カルシウムが約10ミリモルの濃度を有する請求項15の方法。

17. 以下の段階を含むポリ-β-ヒドロキシ脂酸の製造法。

エセリキア・コリ細菌宿主の培養を供給すること、各宿主はポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩生成経路をコードしているデオキシリボ核酸配列を含んでいるベクターにより形質転換されており、各宿主はポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩の生成のために炭素源としてホエイを用いる能力を有する。

ホエイを含んでいる最小培地に24時間より大の期間エセリキア・コリ細菌宿主の培養を生育すること、該エセリキア・コリ細菌宿主の各々は細胞内のポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩を生成する。

該培養に該エセリキア・コリ細菌宿主を溶解し、溶液中に該ポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩を放出すること、及び

該ポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩を集めること。

## 明 細 書

形質転換したエセリキア・コリにおけるポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩の改良生産

### 技術分野

本発明は、一般にポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩(PHB)生成経路をコードしている遺伝子を有しているベクターにより遺伝的に形質転換されたエセリキア・コリ(イー、コリ)を用いるPHBの生成に、より詳しくは形質転換されたイー、コリでのPHBの効率的生成に関する。

### 背景技術

PHBは環境ストレスに対する種々の細菌により生成されるエネルギー貯蔵材料であり、ポリプロピレンに似た性質を有するD-(-)-3-ヒドロキシ脂酸塩のホモポリマーである。PHBは生物分解できるので、ヒトのごみの環境影響を減らすために他のプラスチック材料とは対照的にパッケージする目的にPHBを用いることかなりの興味がある。PHBは又、抗生物質、ドラッグ・デリバリー、固形結合及び骨置換適用に有用性を有する。PHBはアルカリゲネス・エウトロフス(エイ、エウトロフス)から商業的に生成され、商品名バイオボールの下に販売される。

スラター等による文献「クローニング・アンド・エクスプレッション・イン・エセリキア・コリ・オブ・グ・アルカリゲネス・エウトロフスH-18ポリ-β-ヒドロキシブチラート・バイオンセンセティブ・パスウェイ」、ジャーナル・オブ・バクテリオロジー、170巻10号、1988年10月、4431-4436頁に記載されるように、イー、コリは、PHB生成経路をコードするエイ、エウトロフスから遺伝子で遺伝的に形質転換できることが示された。イー、コリは、細菌、イー、コリを取扱うについて知られているので、即ち、イー、コリはより容易に調製され、扱われるので、エイ、エウトロフスよりもPHBを生成するのによりはるかに良好なベクターである。形質転換したイー、コリは比較的大量にPHBを発現し得た。

18. 以下の段階を含む形質転換されたエセリキア・コリ細菌宿主の培養に、細胞内に生成したポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩を回収する方法であって、該宿主はポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩生成経路をコードしているデオキシリボ核酸配列を含んでいるベクターにより形質転換されている。

該エセリキア・コリ細菌宿主を溶解して溶液中に該ポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩を放出すること、

固酸マグネシウム、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム及び塩化カルシウムからなる群から選ばれた十分量のイオン試薬を加えること、該十分量の該イオン試薬は該溶液中、該ポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩を固化する、及び

該溶液を濾心して該固化したポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩をベレット化すること。

19. 該イオン試薬の塩化カルシウムである請求項18の方法。

20. 該塩化カルシウムが1モルと1ミリモルの間にわたる濃度で存在する請求項18の方法。

21. 該塩化カルシウムが約10ミリモルの濃度で存在する請求項20の方法。

22. ポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩生成経路において、3つの遺伝子配列の最初のDNA配列に位置する最初の400のヌクレオチド塩基及びポリ-β-ヒドロキシ脂酸塩生成経路において、3つの遺伝子配列の第3の後のDNA配列に位置する第2の400のヌクレオチド塩基をほぼ含んでいる複製され、分離されたDNA配列。

23. p4Aとして設計され、寄託番号68329の下にエセリキア・コリ株HMS174がジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されたプラスミド。

24. ベクターがp4Aプラスミドを含む請求項13の方法。

25. ベクターがp4Aプラスミドを含む請求項17の方法。

26. ベクターがp4Aプラスミドを含む請求項18の方法。

他の材料以上のPHBの利点にもかかわらず、生成が高価であるので市場での実用を妨げて来た。最近PHBは、ルリアブロス(LB)にイー、コリを生育し、炭素源としてグルコースを用いることにより形質転換したイー、コリに生成させる。PHBの生成コストの約1/8はLBに言ふ培養地及びグルコースのコストに帰することができる。高価でない炭素源を利用できればPHB生成の全体のコストは有意に減ずることができる。加えて、PHB生成の全体のコストの多くは、イー、コリ中に生成されたPHBを精製するのに帰することができる。最近、PHBは濾心、次いで細胞の機械的溶解によりPHBを放出し、高濃縮液でPHBを固くし、最後にスプレードライ段階で精製された粒子を得るにより精製する。もしイー、コリからPHBを集める高価でない方法が入手できれば、PHB生成の全体のコストは有意に減ずることができる。

### 発明の開示

従って、形質転換されたイー、コリにPHBを生成する改良された技術を提供することが本発明の目的である。これまでのイー、コリより高いレベルでPHBを培養でき、生育条件のためにホエイを含んでいる最小培地を用いることができる形質転換されたイー、コリ株を提供することが本発明の他の目的である。

イオン溶液を用い溶解したイー、コリ細胞からPHB粒子を分離させる方法を提供することが本発明のさらに他の目的である。

本発明により、イー、コリの株、即ちイー、コリHMS174がPHB生成経路及び経路の上流及び下流の約400の余分の塩基を有するプラスミドを含んでいるベクターにより形質転換された。イー、コリのHMS174株は、それがラクトース利用系を含み、置換欠損で、そのためラクトース遺伝部分を含んでいるプラスミドが置換えられず構造物を不安定にしないので選ばれた。ホエイはチーズ製造からの廃棄生成物で非常に安い。形質転換したイー、コリの株がホエイを含んでいる最小培地で生育し約85%のPHBの平均収率(PHB乾燥重量/全細胞乾燥重量)を有することを示す実験がなされた。加えて、形質転換されたイー、コリに生成したPHBは僅かのイオン溶液で固くすることを示す実験

がなされた。複製されたPHBを大量に回収するため、形質転換されたイー、コリ細胞はまず機械的または物理的手段、例えば音波処理により又は遠低的手段により溶解する。次いで細胞は、イオン溶液、例えば100ミリモル(mM)塩化カルシウム( $\text{CaCl}_2$ )中でインキュベートし、PHB粒子を固める。最後に固まりは低速度で培養物から遠心する。実験は、培養物中のほとんど全て(100%)のPHBがこの方法により固り、回収されることを示す。結果は、同じ型の固化がエイ、エウトロフスからPHBを回収するには不可能であるので特に制限的である。

#### 図面の簡単な説明

前述の及び他の目的、趣意及び利点は、図面を引用して本発明の好ましい実施形態の以下の詳細な記載からよりよく理解されよう。図において、

図1は、PHB蓄積量なるプラスミド構造物を含んでいる種々のイー、コリクローンへの時間を示す線グラフである。

図2a及び2bは最小増地及びホエイを用いた形質転換されたイー、コリにより生成したPHBの蓄積を示す線グラフである。

図3は、 $\text{CaCl}_2$ を用いるPHB固化のパーセントを示す線グラフである。

図4は、PHB固化に対するPHBが放射線感受性グルコースの存在で遅延し、次いで固化手段に付される時間を示す線グラフである。そして、

図5は、PHB固化へのガラス牛乳及びカルシウムの対照的効果を示す線グラフである。

#### 発明実施のベストモード

図面、より詳しくは図1を引用して、プラスミドp4sを含んでいるイー、コリ株HMS174は、異なるプラスミド構造物を含んでいる他のイー、コリクローンよりも短い期間により大きなパーセントのPHBを蓄積することを示す。イー、コリ株HMS174はエイル・イー、コリ・ストック・センター、バーバラ・バックマン、支那人から入手できる。p4sプラスミドはPHB生成経路及びベクター-pTZ-18U上PHB生成経路の上流及び下流側に約400の余分の塩基

を有する。ベクター-pTZ-18Uはユニテッド・ステイツ・バイオケミカルズから入手できる。MSAは、ベクター-pTZ-18U上にPHB生成経路及び他の適合プラスミド上にファージphiX174からのE-溶解遺伝子を有する。MSAは、それがPHB生成経路の上流に約400の余分の塩基を有することによって異なる(即ちPHB生成経路はpTZ-18Uにクローンされて「MSA」と呼ばれるpTZ-18U-PHBを作り、P4Aは、プロメガ・コーポレーションから入手できるベクター-pGEM-7F+上のPHB生成経路の上流側のpTZ-18U-PHB400より少ない塩基である。

p4A、pTZ-18U-PHB(MSA)及びpGEM7f-PHB(GEM)クローンは、全て、慣用の分子クローニング技術を用いて引用し、導入された同時保真特許出願及び雑誌論文で検討されたPHB生成経路を含むイー、コリクローンから構成された。特許出願及び雑誌論文で開示したように、PHB生成経路はエイ、エウトロフスから分離し、イー、コリで発現できる。生成経路は約5キロ塩基の長さでβ-ケトテオラーゼ、NADP-結合アセトアセチル-CoA-シメイルA(CoA)レダクターゼ及びPHBシンターゼをコードする塩基を含んでいる。図1はMSA及びGEMクローンがP4Aクローンほど多くPHBを生成しないことを示す。

イー、コリHMS174はそれがラクトース利用系を含み、そしてそれが組織欠損であるので宿主として選んだ。組織欠損は、ラクトース運搬部分を含んでいるプラスミドが組織せず、構造物を不安定にしないことを保証する。以下に述べるように、HMS174でのラクトース利用系の存在により、ホエイ、その主成分がラクトースであるチーズ製造副産物物はPHB生成の炭素源として用いられる。形質転換されたイー、コリ株を作るについて、PHB生成経路プラス ユニテッド・ステイツ・バイオケミカル・ベクター-pTZ-18UにクローンされたPHB生成経路の400塩基上流及び下流であるプラスミドp4sはイー、コリHMS174に電気変換される。p4sプラスミドを含んでいるイー、コリの株は、1990年5月23日に12801パークローン・ドライブ・

250ul 20%カゼミノ酸

20ul 20%ホエイ溶液

接種した培養は250ulの接種液(baffled)プラスミド300rpmでオービタルインキュベーターシェーカーで37℃で48時間生育した。48時間のインキュベーション時間後、培養を止めて細胞を集めた。ガスクロマトグラフィーを用いてPHB含量を分析した。

図2a及び2bはそれぞれ、細胞の全重量で割った細胞当たりのPHB重量として表わした細胞中に蓄積したPHBのパーセント及び最小増地を有する培養中の異なる濃度のホエイに対し、mg/mlで示したPHBとして表わした細胞中のPHBの収量を示す。図2a及び2bは、非常に低濃度のホエイ、即ち溶液中2%でさえ、高濃度のPHB蓄積(即ち90%より大)及び高収量のPHB(即ち約10ml/ml)であることを示す。図2a及び2bが高い濃度のホエイを有する増地がより大きな濃度及び収量のPHBを生成する傾向があったことを示す一方、ホエイ濃度が8%を超えた後、PHB生成が下り始めることが認められた。

上の実験で、PHB生成は48時間のインキュベーション後分析されたが、有意なPHB生成が24時間のインキュベーション後、観察されたことに注意すべきである。加えて、5X最小増地増地での $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 及び $\text{NaCl}$ の比較濃度及び5X最小増地、2回高麗水、 $\text{MgSO}_4$ 、チアミン、カゼミノ酸及びホエイ溶液の比較濃度は変えることができ、一方ラクトース利用系を有する形質転換されたイー、コリ宿主で依然としてPHBの生成がなされることが予測される。

ホエイが最小増地に存在するPHBの生成に炭素源としてホエイを用いることは、PHB生成にグルコースを伴う高い増地を用いる先行技術の慣行を越えてかなりの費用削減となることが期待される。PHB生成経路をコードしているプラスミドを有し、同時保真特許出願及び雑誌論文で検討された先行技術の形質転換されたイー、コリ細胞は、それらの細胞がここに存在するラクトース利用系を有しないので、炭素源としてホエイを用いて生育できなかった。PHBは、その

ロックウィル・Mdのジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、寄託番号68629を有する。

p4sプラスミドで形質転換したイー、コリのHMS174株がホエイを含んでいる最小増地に生育できることを示す実験が行なわれた。用いられた最小増地はほとんどの微生物学的生物学テキストに記載されるM9最小増地であった。表1はM9最小増地の5X濃縮物の処方を表示し、表示した成分の各々は1リットルプラスコに加え、水は1リットルまで加える。

表1

5X Mの最小増地処方  
30g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
15g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
5g  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
2.5g  $\text{NaCl}$

ホエイは、シグマ・ケミカルズからウシホエイの粉末として得、1000mlの最終量を有する水に20gのホエイを溶解することにより作った。濃度は約30分間ゆるやかに加熱して行なった。次いでこの溶液をオートクレーブにかけ、遠心の間沈殿した粒子を10分間10,000×gで遠心することによりペレットとした。残っている上清をホエイ炭素源として用いた。

実験では、プラスミドp4sを含んでいるHMS174イー、コリ株を平板培養から500mlのM9最小増地+ホエイ溶液に接種した。表2は、8%の最終濃度でホエイを含んでいる500mlの最小増地から処方を表示する。

表2

PHB生成用最小増地+ホエイ  
10ul 5X M9増地  
20ul  $\text{dH}_2\text{O}$  (2回蒸留水)  
50ul 1MMgSO<sub>4</sub>  
5ul 0.5%チアミン

細菌もラクトース利用系に欠けるので、その炭素源としてホエイを用いた自生の宿主、アルカリゲネス・エウトロフスに生成され得ない。加えて図1に示されるように、特殊なプラスミドp4aで特異なイー、コリ宿主を形質転換することは、イー、コリがPHB生成経路をもコードする異なるベクターで形質転換された場合よりも高いパーセントでPHBを生成させる。

PHBはその自生の宿主(イー、エウトロフス)よりむしろイー、コリに生成されているので、出願人は形質転換されたイー、コリにより生成したPHB単りマはイー、エウトロフスに生成したPHBとは異なる物理的性質を有すると信じた。特に出願人は、形質転換されたイー、コリにより生成されたPHBが種々のイオン溶液によって固化するかを測定するため実験を行なった。実験によって、PHBは、上で取込まれた同時保菌特許出願及び臨時論文で検討したように形質転換されたイー、コリに生成した。簡単に云うと、PHB-生成株を1%グルコースを含んでいるルリアブロス(LB)中24時間37℃で振盪フラスコ培養で生育する。細胞を遠心(2,000×g5分)によりペレットとし、次いで元の培養と等しい容量の水に再び懸濁する。細胞を次いで超音波処理により溶解し、種々のイオン試薬を溶液に加えた。表3は種々のイオン溶液による形質転換されたイー、コリに生成したPHBへの集合効果を示す。

表3

種々のイオン溶液によるPHBの集合

溶液*	集合程度**
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	++
NaCl	+
CsCl	-
MgSO <sub>4</sub>	+++
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	+
MgCl <sub>2</sub>	++++
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	+

CaCl<sub>2</sub>により固まるPHBのパーセント対溶液に懸るPHBのパーセントを決定するために実験がなされた。実験において、イー、コリのPHB-生成株は1%放射標識グルコースを含んでいるルリアブロス中、24時間37℃で振盪フラスコ培養で生育した。細胞は遠心(2,000×g5分)によりペレットとし、次いで元の培養に等しい容量の水に再び懸濁した。次いで細胞を超音波処理により溶解し、次いで溶液を1M塩化カルシウム溶液の添加により10mMとした。管を10分室温でインキュベートし、次いで400×g2分間遠心した。固化したPHB粒子がペレット化し、一方多くの細胞残骸が上清液に残った。次いで上清を吸引した。ペレット及び上清におけるPHBの分配を測定するためペレットと上清を毛细管ガスクロマトグラフィー又は液体シンチレーション計数を用いて測定した。

図3は培養におけるほとんど全て(100%)のPHBが上記方法により固化した回収されたことを示す。この実験でPHBの量はガス毛细管クロマトグラフィーでのみ測定した。この実験はフラスコの容量が固化する程度に影響するかどうかを測定するため幾つかの細胞容量で行ない、全ての容量において、全てのPHBが固化したし、遠心により實質的にペレット化することが判った。

図4は培養は固化する十分な時間経過させることが極度に重要であり、さもないと収率が低くなることを示す。溶液を10mM CaCl<sub>2</sub>に調製した後、たゞより10分インキュベーション時間を取り、ペレット及び上清フラクションを同様に2分間隔で計数した。図4は、CaCl<sub>2</sub>添加後最初の数分間は上清に存在するPHBの量はペレットにおけるものより遥かに大であることを示す。しかしながら8分後(ペレット中に測定されたPHBの量は、平らになり始める)ペレットにおけるPHBの量は、上清フラクションにおけるものよりずっと多い。この時点で、この実験は、そのほとんどが14C-グルコースとしてPHBに取込まれ(約60%に取込まれる)が、その後からは溶解性物質として存在する放射活性14炭素を測定することに注意すべきである。従って、ほとんど全てのPHBが沈降しても溶解性放射活性グルコースのために依然として上清に多くの数の計数が存在

MgOAc	++++
NaOAc	++
KCL	-
KOAc	-
CaCl <sub>2</sub>	++++
(NH <sub>4</sub> )OAc	-

\*全ての溶液は1Mの最終濃度であった。\* \*図りは各集合体のミクログラフを用いて主観的に格付けした。「++++」は最善の固りを示し、「+」は最低量の固りを示す。「-」は固りのないことを示す。

表3は幾つかのイオン溶液が形質転換されたイー、コリに生成したPHBを固化することを示す。最善の固化剤は固りの速度及び大きさに関する主観的判定に基づきCaCl<sub>2</sub>であった。CaCl<sub>2</sub>の固化効果は、その自生イー、エウトロフスに生成したPHBを固化しない(即ち、PHB粒子は溶解したアルカリゲネスH16エウトロフスから得られた、塩化カルシウムで処理して固化が観察されない実験がなされた)。

実験はPHBを固化するのに用いるCaCl<sub>2</sub>の理想的濃度を決定するためになした。実験において、形質転換されたイー、コリ細胞を調製し、上述したように溶解した。次いで溶液は、1M貯蔵CaCl<sub>2</sub>溶液を用いた異なるmM CaCl<sub>2</sub>濃度とした。低濃度のCaCl<sub>2</sub>、例えば1mMでは、PHB粒子を固化するのに非常に長時間を要し、少しの固化体しか生成しなかった。高濃度のCaCl<sub>2</sub>、例えば100mM及びそれ以上では、固化はほとんど瞬間的に起こり、大きな「管のフレーク」様粒子となり、管の底に積もった。しかしながら高濃度のCaCl<sub>2</sub>で得られた固りは大量の細胞残骸を有するように見えた。従って高濃度のCaCl<sub>2</sub>は固化に望ましくない。中濃度のCaCl<sub>2</sub>、例えば5mMないし30mMを用いた場合、ペレットを作った増地の固化が5ないし15分の短いインキュベーションで起きた。固化物形成の速度及び大きさの点で最良の固化結果を生ずるために10mM CaCl<sub>2</sub>の使用が決定された。

する。

図5は、PHBの固化作を成形剤、例えばバイオ101から入手できるガラスミルクの添加により強めることができることを示す。図5において、ペレット及び上清の分当りの計数(CPM)を表わし、「+ga.+Ca」はガラスミルク及び10mM CaCl<sub>2</sub>の存在でのPHB固化を示し、「-ga」はガラスミルクは存在せず10mM CaCl<sub>2</sub>の存在でのPHB固化を示し、「-ga.-Ca」はガラスミルク及びCaCl<sub>2</sub>の不存在でのPHB固化を示し、そして「+Ca」はガラスミルクの存在下、CaCl<sub>2</sub>の不存在でのPHB固化を示す。図5から、成形剤の添加による固化の強化は、それほど大きくなり、従って、大量の生成計画ではこのような剤の使用によって大きな利益が考えられることはないことが判る。

本発明は、大量のPHBを蓄積できる形質転換されたイー、コリ株を処理し、一方、PHB生成のため安価な炭素源、例えばホエイを使用し、イオン溶液、例えばCaCl<sub>2</sub>がPHBを固化するのに使用できるその好ましい実施態様に関して記載されたが、この分野の当業者は本発明が添付された請求の範囲の精神及び範囲内で修飾して実施できることを理解するであろう。

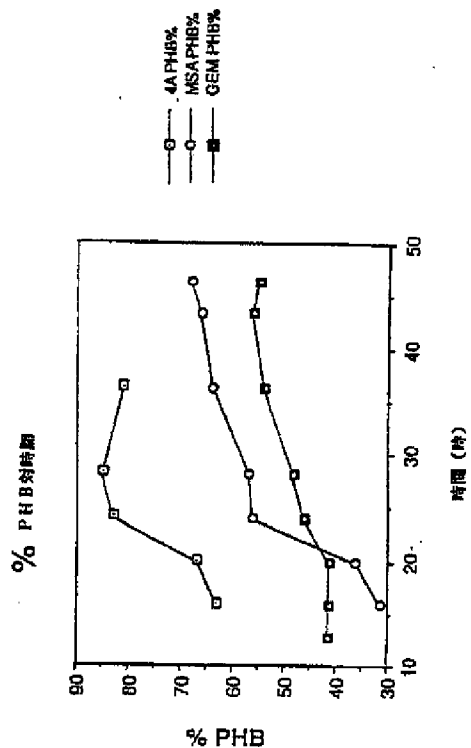


FIG. 1

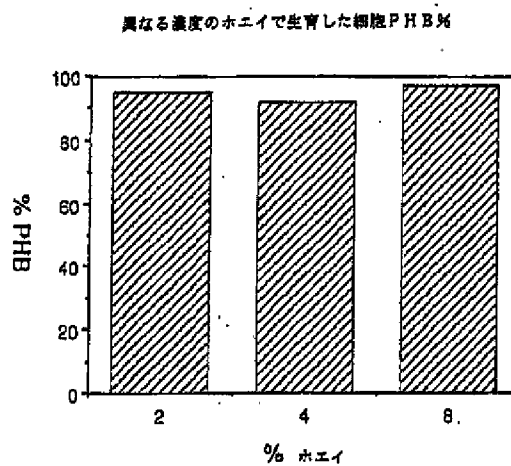


FIG. 2a

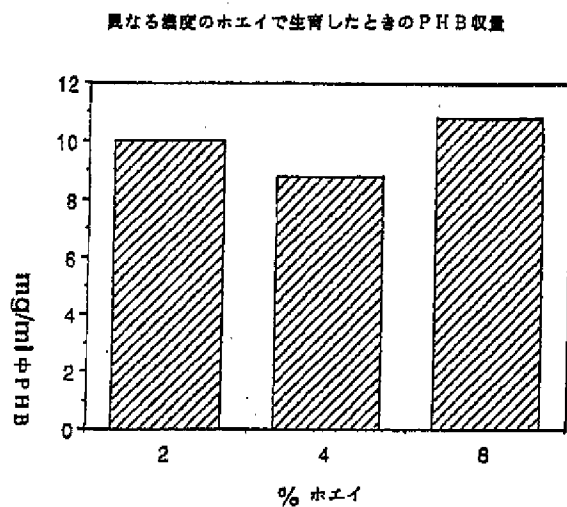


FIG. 2b

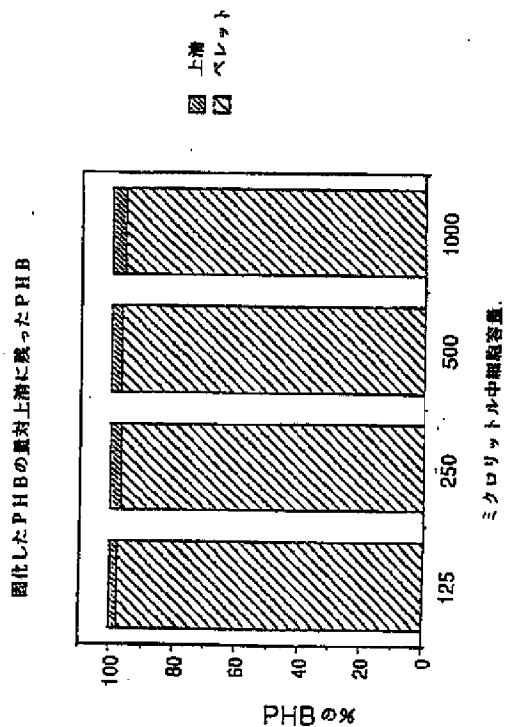


FIG. 3







【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】平成11年(1999)1月12日

【公表番号】特表平5-507410  
 【公表日】平成5年(1993)10月28日  
 【年通号数】  
 【出願番号】特願平3-510838  
 【国際特許分類第6版】

C12N 15/00  
 1/20  
 1/21  
 C12P 7/62  
 //(C12N 1/21  
 C12R 1:19 )  
 (C12P 7/62  
 C12R 1:19 )

【F I】

C12N 15/00  
 1/20 A  
 1/21  
 C12P 7/62

手 続 補 正 書

10.5.90

平成 年 月 日

特許庁長官 滝井 秀 光 殿

通

1.事件の表が 平成3年特許第510838号

2.補正をする者

事件との関係 出 願 人

名 称 センター・フォー・イノベティブ・  
 テクノロジー

3.代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号  
 電 話 (代) 3211-8741

氏 名 (5995) 井 上 中 村 敬

4.補正命令の日付 日 時

5.補正対象書類名 明細書

6.補正対象項目名 請求の範囲

7.補正の内容 別紙記載の通り

請 求 の 範 囲

1. ポリーβ-ヒドロキシ酸塩基合成経路をコードするデオキシリボ核酸を含むベクターにより形質転換されたラクトース利用系を有するエセリキア・コリ細菌宿主。
2. 該デオキシリボ核酸配列が、該ポリーβ-ヒドロキシ酸塩基合成経路の3つの遺伝子配列の最初の遺伝子配列より前に位置する該デオキシリボ核酸配列内の第1の400ヌクレオチド塩基及び該ポリーβ-ヒドロキシ酸塩基合成経路の3つの遺伝子配列の3番目の遺伝子配列より後に位置する該デオキシリボ核酸配列内の第2の400ヌクレオチド塩基を含む請求項1記載のエセリキア・コリ細菌宿主。
3. A.T.C.C.菌記番号08328を有する請求項2記載のエセリキア・コリ細菌宿主。
4. 該宿主がエセリキア・コリ株HMS174から誘導される請求項1記載のエセリキア・コリ細菌宿主。
5. 該ベクターがプラスミドpTZ18Uである請求項1記載のエセリキア・コリ細菌宿主。
6. ポリーβ-ヒドロキシ酸塩基合成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含むベクターにより形質転換されたエセリキア・コリ細菌宿主であって、同取可能量のポリーβ-ヒドロキシ酸塩基を生成するための炭素源としてホエイを利用する能力を有することを特徴とするエセリキア・コリ細菌宿主。
7. 該デオキシリボ核酸配列が、該ポリーβ-ヒドロキシ酸塩基合成経路の3つの遺伝子配列の最初の遺伝子配列より前に位置する該デオキシリボ核酸配列内の第1の400ヌクレオチド塩基及び該ポリーβ-ヒドロキシ酸塩基合成経路の3つの遺伝子配列の3番目の遺伝子配列より後に位置する該デオキシリボ核酸配列内の第2の400ヌクレオチド塩基を含む請求項6記載のエセリキア・コリ細菌宿主。
8. ポリーβ-ヒドロキシ酸塩基合成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含むベクターにより形質転換されたエセリキア・コリ細菌宿主であって、同取可能量のポリーβ-ヒドロキシ酸塩基を生成するための炭素源として炭水化物

- 地を利用する能力を有することと特徴とする上記エセリキア・コリ細菌宿主、
9. 該デオキシリボ核酸配列が、該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩生成経路の3つの遺伝子配列の最初の遺伝子配列より前に位置する該デオキシリボ核酸配列内の第1の488ヌクレオチド塩基及び該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩生成経路の第3つの遺伝子配列の3番目の遺伝子配列より後に位置する該デオキシリボ核酸配列内の第2の400ヌクレオチド塩基を含む請求項8記載のエセリキア・コリ細菌宿主、
  10. 最小培地及びホエイを含む形質転換されたエセリキア・コリ宿主においてポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を生成するための培地であって、該形質転換されたエセリキア・コリ宿主は、ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩生成経路を含み、ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を生成するための炭素源として該ホエイを利用する能力を有する、上記培地、
  11. 該最小培地が該培地の20%であり、該ホエイが該培地の40%であり、および水が該培地の40%である請求項10記載の培地、
  12. 0.6%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、  
0.3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、  
0.1%塩化アンモニウム、  
0.05%塩化ナトリウム、  
58.64%水、  
0.012%硫酸マグネシウム、  
0.0005%チアミン、  
0.01%カザミノ酸及び  
40%ホエイ溶液  
を含む、形質転換されたエセリキア・コリ宿主においてポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を形成させるための培地、
  13. 以下の成分を含むポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸の製造法：  
エセリキア・コリ細菌宿主の培養を供給すること、各宿主はラクトース利用系を有し、各宿主は、ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含むベクターにより形質転換されている；

- ホエイを含む最小培地に24時間より長い期間、エセリキア・コリ細菌宿主の該培養を生育すること、該エセリキア・コリ細菌宿主の各々は細胞内にポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を生成する；  
該培養中に該エセリキア・コリ細菌宿主を溶解し、溶液中に該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を放出すること；及び  
該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を採取すること、
14. 採取する該段階が、溶解したエセリキア・コリ細菌宿主及びポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を含む該培養を硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム及び塩化カルシウムからなる群から選ばれたイオン試薬にさらす段階を含み、該イオン試薬は該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を塩化するのに十分な濃度である、請求項13記載の方法、
  15. 該イオン試薬が1モル〜1ミリモルの濃度の塩化カルシウムである請求項14記載の方法、
  16. 塩化カルシウムが10ミリモルの濃度を有する請求項15記載の方法、
  17. 以下の段階を含むポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸の製造法：  
エセリキア・コリ細菌宿主の培養を供給すること、各宿主はポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含むベクターにより形質転換されており、各宿主はポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を生成するための炭素源としてホエイを利用する能力を有する；  
ホエイを含む最小培地に24時間より長い期間エセリキア・コリ細菌宿主の該培養を生育すること、該エセリキア・コリ細菌宿主の各々は細胞内にポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を生成する；  
該培養中に該エセリキア・コリ細菌宿主を溶解し、溶液中に該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を放出すること；及び  
該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を採取すること、
  18. 以下の段階を含む、形質転換されたエセリキア・コリ細菌宿主の培養中の、細胞内に生成したポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を回収する方法であって、該宿主はポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含むベクターにより形質転換されていることを特徴とする上記方法；

- 該エセリキア・コリ細菌宿主を溶解して溶液中に該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を放出すること；  
硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム及び塩化カルシウムからなる群から選ばれた十分量のイオン試薬を加えること、該十分量の該イオン試薬は該溶液中、該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩を塩化する；及び  
該溶液を過心して濃縮化したポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩をベレット化すること、
19. 該イオン試薬が塩化カルシウムである請求項18記載の方法、
  20. 該塩化カルシウムが1モル〜1ミリモルの濃度を有する請求項18記載の方法、
  21. 該塩化カルシウムが10ミリモルの濃度を有する請求項20記載の方法、
  22. ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩生成経路の3つの遺伝子配列の最初の遺伝子配列より前に位置するDNA配列内の第1の488のヌクレオチド塩基及びポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸塩生成経路の3つの遺伝子配列の3番目の遺伝子配列より後に位置するDNA配列内の第2の400のヌクレオチド塩基を含む、複製され、分離されたDNA配列、
  23. エセリキア・コリ株HMS174により形質転換番号8889の下にジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに提供された、p4Aという名称のプラスミド、
  24. ベクターがp4Aプラスミドを含む請求項13記載の方法、
  25. ベクターがp4Aプラスミドを含む請求項17記載の方法、
  26. ベクターがp4Aプラスミドを含む請求項18記載の方法、